昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, December 2004, 47(6): 744 – 748 ISSN 0454-6296

四种去垢剂对棉铃虫微粒体细胞色素 P450 的增溶与变性作用

郑明奇[1,2], 张文吉[1], 邱星辉[2*], 冷欣夫[2], 何凤琴[2], 李　梅[2]
(1. 中国农业大学应用化学系,农业部农药化学及使用技术重点实验室,北京　100094;
2. 中国科学院动物研究所,农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室,北京　100080)

摘要: 为分离纯化棉铃虫的细胞色素 P450,比较了 4 种去垢剂对棉铃虫微粒体 P450 的增溶与变性作用。结果表明: CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)- dimethylammonio]-1-propanesulfonate)能有效地增溶中肠和脂肪体微粒体 P450,而 Lubrol PX(聚氧乙烯十二烷基乙醇醚)、Emulgen 911(聚氧乙烯壬基苯酚醚)和胆酸钠的增溶效果较差; CHAPS 对中肠和脂肪体微粒体 P450 的最适增溶浓度分别为 0.5%和 0.5% ~ 0.8%; 终浓度为 0.5%时,4 种去垢剂对中肠和脂肪体微粒体 P450 的变性作用不明显。

关键词: 棉铃虫; 细胞色素 P450; 去垢剂; 增溶作用; 变性作用
中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2004)06-0744-05

Effects of four detergents on solubilization and denaturation of microsomal cytochrome P450s in *Helicoverpa armigera*

ZHENG Ming-Qi[1,2], ZHANG Wen-Ji[1], QIU Xing-Hui[2*], LENG Xin-Fu[2], HE Feng-Qin[2], LI Mei[2] (1. Key Laboratory of Pesticide Chemistry and Application Technology, Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: To facilitate the separation and purification of cytochrome P450s in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, the effects of 4 detergents on the solubilization and denaturation of microsomal P450s from this pest were examined. The results showed that CHAPS efficiently solubilized the microsomal P450 of midgut and fatbody, while Lubrol PX, Emulgen 911 and sodium cholate were less efficient. The suitable solubilization concentrations of CHAPS for microsomal P450s of midgut and fatbody were 0.5% and 0.5% – 0.8% respectively. Denaturation effects of CHAPS, Lubrol PX, Emulgen 911 and sodium cholate at the concentration 0.5% on microsomal cytochrome P450s of midgut and fatbody were insignificant.

Key words: *Helicoverpa armigera*; cytochrome P450; detergent; solubilization; denaturation

细胞色素 P450(简称 P450)是一类普遍存在于生物体中的血红素结合蛋白,在生物体内源性化合物的生物合成与代谢,以及外源性化合物的降解与转化中发挥着重要作用。P450 在昆虫中的作用关系到昆虫的生长、发育及其抗逆性,具有重要的生物学和进化意义。由于 P450 是以多种类型共存于同一生物体中, 不同类型的 P450 的性质和功能有所不同, 为了分析不同类型 P450 的结构和功能,须通过一定的分离纯化手段分离出单型 P450。

真核生物中的 P450 是一类疏水性强的膜结合蛋白,多存在于内质网膜或线粒体膜中,与水样缓冲液的相容性差。在 P450 的提取、分离过程中必须通过加入去垢剂来破坏膜环境使其溶解,即 P450 的增溶。P450 的不稳定性以及与膜结合蛋白的分离是增溶过程中面临的重要困难。由于不同去垢剂的增溶效率、变性作用以及最适使用浓度等有较大差异,加上昆虫 P450 的比含量低、稳定性差等特点,去垢剂的选择对于昆虫 P450 的分离纯化十分重要。至今,大多数有关去垢剂对 P450 增溶作用的报道来源于有关哺乳动物的研究结果, 而常用去垢剂对棉铃

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270885)
作者简介: 郑明奇,男,1971 年生,湖南临澧人,博士,研究方向为农药毒理与使用技术,E-mail: zhengmq1999@sina.com.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: qiuxh@ioz.ac.cn
收稿日期 Received: 2004-02-11; 接受日期 Accepted: 2004-04-28

虫 P450 的作用还未见报道。鉴于此，作者对胆酸钠、CHAPS（3-[（3-cholamidopropyl）-dimethylammonio]-1-propanesulfonate）、Lubrol PX（聚氧乙烯十二烷基乙醇醚）和 Emulgen 911（聚氧乙烯壬基苯酚醚）对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠和脂肪体微粒体 P450 的增溶性质和可能的变性作用进行了比较研究。

1　材料与方法

1.1　供试棉铃虫

1988 年采自河北邯郸，于室内无药剂接触条件下连续饲养至今。

1.2　实验试剂

胆酸钠（> 97%）和考马斯亮蓝 R250（分析纯）为 Fluka 公司产品；CHAPS（> 99%）、Lubrol PX（分析纯）、聚乙二醇 8000（PEG8000，分析纯）、乙二胺四乙酸（EDTA，分析纯）、牛血清白蛋白（BSA，分析纯）、二硫代苏糖醇（DTT，> 99%）、苯基硫脲（PTU，分析纯）和苯甲磺酰氟（PMSF，> 99%）均为 Sigma 公司产品；Emulgen 911（> 97%）为美国 Karlan 研究所提供；低分子量蛋白质标准为 Pharmacia 公司产品；连二亚硫酸钠（分析纯）为北京东环联合化工厂产品。

1.3　棉铃虫微粒体 P450 的诱导

参照 Qiu 等（2003）方法，将五甲基苯按 0.2%（m/m）比例拌入一定量的人工饲料中，搅拌均匀后分装在已灭菌的十孔盒中，然后挑选整齐一致、刚进入 5 龄的棉铃虫幼虫，饲养 48 h，取其中肠和脂肪体提取微粒体 P450。

1.4　棉铃虫微粒体 P450 酶液的制备

参照 Qiu 等（2003）方法，在蜡盘上纵向解剖棉铃虫，取出中肠和脂肪体，去除内容物后置于冰冷的匀浆缓冲液[pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液中含 1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L DTT、1 mmol/L PTU（溶于乙二醇独甲醚）、1 mmol/L PMSF（溶于乙二醇独甲醚）、10% 甘油]中漂洗，然后置于电动玻璃匀浆器中并加入适量的匀浆缓冲液匀浆；匀浆液于 10 000 × g 离心 15 min，上清液经 2 层纱布过滤后于 105 000 × g 离心 60 min，沉淀用重悬浮缓冲液（pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液中含 1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF、20% 甘油）重新悬浮；重悬浮后的微粒体用 Eppendorf 管分装，于 − 80℃ 下保存备用。以上所有操作在冰上或 0 ~ 4 ℃ 下进行。

1.5　棉铃虫微粒体 P450 的增溶

1.5.1　不同去垢剂对微粒体 P450 的增溶：参照 Wheelock 等（1989）方法，将备用的中肠或脂肪体微粒体悬浮液在冰上融化，用重悬浮缓冲液稀释至蛋白浓度为 2 mg/mL；然后分别加入 10% 的 CHAPS、Lubrol PX、Emulgen 911 和胆酸钠，至终浓度为 0.5%，以加入相同体积的重悬浮缓冲液为对照，轻轻摇匀后在冰上静置 4 h，然后加入 40% PEG8000，至终浓度为 8%，轻轻摇匀后在冰上静置 30 min 后，在 10 000 × g 离心 15 min（4℃），取上清液进行 P450 和 P420 含量测定。

1.5.2　不同浓度 CHAPS 对微粒体 P450 的增溶作用：将备用的中肠（脂肪体）微粒体悬浮液在冰上融化，用重悬浮缓冲液稀释，至蛋白浓度为 2 mg/mL；然后加入 10% 的 CHAPS，至终浓度分别为 0、0.2%、0.5%、0.8% 和 1.1%，并用重悬浮缓冲液将体积补至相同，轻轻摇匀后在冰上静置；4 h 后加入 40% PEG8000，至终浓度为 8%，轻轻摇匀后在冰上静置；30 min 后在 10 000 × g 离心 15 min（4℃），取上清液进行 P450 和 P420 含量测定。

1.6　棉铃虫微粒体 P450、P420 含量的测定

参照 Omuro 和 Sato（1964）方法，将微粒体悬浮液用 pH 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液稀释至浓度约为 0.3 ~ 0.4 mg/mL，然后加入连二亚硫酸钠 4 ~ 5 mg 还原；5 min 后一分为二，分别置入参比池和样品池中记录基线；然后在样品池中通入一氧化碳（CO）1 min，静置 10 min 后进行 390 ~ 500 nm 全波长扫描，并记录扫描曲线和 OD 值。根据波长在 450 ~ 490 nm 间的吸光度差值以及摩尔消光系数[91 cm^{-1}·$(mmol/L)^{-1}$]计算微粒体中 P450 含量。

P420 含量测定方法与 P450 测定方法相同，根据波长在 420 ~ 490 nm 间的吸光度差值以及摩尔消光系数[110 cm^{-1}·$(mmol/L)^{-1}$]计算微粒体中 P420 含量。

1.7　蛋白浓度测定

按 Bradford（1976）方法，以牛血清白蛋白（BSA）为标准蛋白。

1.8　数据分析

应用 SPSS11.0 软件进行数据统计分析。

2　结果与分析

2.1　不同去垢剂对棉铃虫微粒体 P450 的增溶和变性作用

2.1.1　去垢剂对微粒体 P450 的增溶效率：由表 1 可知，未加去垢剂，但经 PEG8000 沉淀后的中肠和

脂肪体微粒体上清液中均未检测到 P450。这是因为真核生物 P450 是一类疏水性膜结合蛋白，没有去垢剂作用时难以溶于水样缓冲液中。

对中肠微粒体 P450，CHAPS 的增溶效率最高，P450 比含量为 0.515 nmol/mg；Lubrol PX、Emulgen 911 和胆酸钠对中肠微粒体 P450 也有一定的增溶作用，但与 CHAPS 的差异极显著。对脂肪体微粒体 P450，CHAPS 的增溶效率最高，P450 比含量为 0.169 nmol/mg，与 Lubrol PX 的差异极显著，与 Emulgen 911 的差异显著；Lubrol PX 和 Emulgen 911 对脂肪体微粒体 P450 均有一定的增溶作用，而胆酸钠未表现出增溶作用。

表 1 不同去垢剂(0.5%终浓度)对棉铃虫中肠和脂肪体微粒体 P450 含量的影响

Table 1 Effects of four detergents at a concentration of 0.5% on contents of cytochrome P450s in midgut and fatbody microsomes of *Helicoverpa armigera*

去垢剂 Detergents	中肠 Midgut		脂肪体 Fatbody	
	P450 含量 Content (nmol/mg)	比率 Ratio	P450 含量 Content (nmol/mg)	比率 Ratio
对照 Control	未检出 Not detected		未检出 Not detected	
CHAPS	0.515 ± 0.050	1.00	0.169 ± 0.010	1.00
聚氧乙烯十二烷基乙醇醚 Lubrol PX	0.176 ± 0.012**	0.34	0.054 ± 0.023**	0.32
聚氧乙烯壬基苯酚醚 Emulgen 911	0.180 ± 0.016**	0.35	0.081 ± 0.015*	0.48
胆酸钠 Sodium cholate	0.226 ± 0.002**	0.44	未检出 Not detected	

注：P450 含量为 3 次实验的平均值 ± 标准差，下同；*，** 分别表示同列数据与 CHAPS 处理组相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。
Notes: P450 contents are mean ± *SD* of three replicates; the same below. * and ** indicate significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ when compared with CHAPS treatment group.

2.1.2 去垢剂对微粒体 P450 的变性作用：P420 被认为是 P450 的变性形式，P420 比含量的高低可用来衡量不同去垢剂对 P450 的变性程度。

由表 2 可知，经终浓度均为 0.5% 的 CHAPS、Lubrol PX、Emulgen 911 和胆酸钠增溶后，中肠和脂肪体微粒体中的 P420 比含量与增溶前微粒体中 P420 比含量的差异不显著。因此，终浓度为 0.5% 时，4 种去垢剂对中肠和脂肪体微粒体 P450 的变性作用不显著。

表 2 不同去垢剂(0.5%终浓度)对棉铃虫中肠和脂肪体微粒体 P420 含量的影响

Table 2 Effects of four detergents at a concentration of 0.5% on contents of cytochrome P420 in midgut and fatbody microsomes of *Helicoverpa armigera*

去垢剂 Detergents	中肠 Midgut		脂肪体 Fatbody	
	P420 含量 Content (nmol/mg)	比率 Ratio	P420 含量 Content (nmol/mg)	比率 Ratio
对照 Control	0.041 ± 0.017	1.00	0.053 ± 0.021	1.00
CHAPS	0.043 ± 0.023	1.05	0.050 ± 0.006	0.94
聚氧乙烯十二烷基乙醇醚 Lubrol PX	0.054 ± 0.025	1.32	0.033 ± 0.004	0.62
聚氧乙烯壬基苯酚醚 Emulgen 911	0.031 ± 0.018	0.76	0.046 ± 0.026	0.87
胆酸钠 Sodium cholate	未检出 Not detected		未检出 Not detected	

2.2 不同浓度 CHAPS 对中肠和脂肪体微粒体 P450 的增溶与变性作用

由表 3 可知，CHAPS 对中肠和脂肪体微粒体 P450 的增溶作用与微粒体中 CHAPS 的终浓度密切相关。对于中肠微粒体 P450，终浓度为 0.5% 和 0.8% 时，CHAPS 的增溶效率高，P450 的比含量分别是 0.718 nmol/mg 和 0.651 nmol/mg，且两者间的差异不显著；终浓度为 1.1% 时，CHAPS 的增溶效率降低，P450 的比含量为 0.550 nmol/mg，与 0.5% CHAPS 间的差异极显著。随着终浓度的增加，CHAPS 对微粒体 P450 的变性作用也在增强，终浓度为 0.8% 时，P420 的比含量为 0.250 nmol/mg，与 0.5% CHAPS 的差异显著；终浓度为 1.1% 时，P420 的比含量为 0.259 nmol/mg，与 0.5% CHAPS 的差异显著。从增溶效率和变性程度看，0.5% CHAPS 对中肠微粒体 P450 的增溶效果最佳。

对于脂肪体微粒体 P450，终浓度为 0.5% 和 0.8% 时，CHAPS 的增溶效率高，P450 的比含量分别是 0.227 nmol/mg 和 0.217 nmol/mg ，且两者差异不显著；CHAPS 浓度为 1.1% 时，P450 的比含量为 0.181 nmol/mg，与 0.5% CHAPS 间的差异显著。此外，随着终浓度的增加，CHAPS 对微粒体 P450 的变性作用无明显增强。因此，0.5% ~ 0.8% 的 CHAPS 对脂肪体微粒体 P450 都表现出较好的增溶效果。

表 3　不同浓度 CHAPS 对棉铃虫中肠和脂肪体微粒体 P450 和 P420 含量的影响

Table 3　Effects on contents of cytochrome P450 and P420 of midgut and fatbody microsomes treated with CHAPS at different concentrations from *Helicoverpa armigera*

浓度(%) Concentrations	P450 (nmol/mg)				P420 (nmol/mg)			
	中肠 Midgut		脂肪体 Fatbody		中肠 Midgut		脂肪体 Fatbody	
	含量 Content	比值 Ratio	含量 Content	比值 Ratio	含量 Content	比值 Ratio	含量 Content	比值 Ratio
0	未检出 Not detected		未检出 Not detected		未检出 Not detected		未检出 Not detected	
0.2	0.433 ± 0.033**	0.60	0.077 ± 0.010**	0.34	未检出 Not detected		0.040 ± 0.038	0.51
0.5	0.718 ± 0.044	1.00	0.227 ± 0.021	1.00	0.084 ± 0.008	1.00	0.078 ± 0.005	1.00
0.8	0.651 ± 0.026	0.91	0.217 ± 0.026	0.96	0.250 ± 0.009**	2.98	0.086 ± 0.035	1.10
1.1	0.550 ± 0.020**	0.77	0.181 ± 0.008 *	0.80	0.259 ± 0.071 *	3.08	0.078 ± 0.012	1.00

注：* 和**分别表示同列数据与 0.5%浓度处理组相比差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。

Notes: * and ** indicate significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ when compared with the 0.5% concentration treatment group.

3　讨论

3.1　不同去垢剂对微粒体 P450 的增溶作用

尽管目前用于 P450 增溶的去垢剂很多，但常用于哺乳动物肝微粒体 P450 增溶的主要有阴离子型(胆酸钠、脱氧胆酸钠)、非离子型(Emulgen 911、Emulgen 913、Renex 690、Lubrol PX、Triton X-100)和两性离子型(CHAPS、Zwittergen 3-14)去垢剂。由于阳离子型去垢剂容易导致 P450 变性或使酶受到不可逆的损害，一般不用于 P450 的增溶。用于 P450 增溶的去垢剂一般应具有增溶效率高、对酶的稳定性和活性影响小、与色谱柱相容性好等特点(Roos, 1996; 郑明奇等, 2001)。

本研究结果表明，4 种去垢剂中，CHAPS 最适于棉铃虫中肠和脂肪体微粒体 P450 的增溶。虽然胆酸钠是哺乳动物肝微粒体 P450 常用的增溶剂(Imaoka and Funae, 1986)，对德国蜚蠊 *Blattela germanica* 微粒体 P450 也表现出较好的增溶作用(Scharf *et al*., 1998)，但胆酸钠对棉铃虫微粒体 P450 的增溶作用表现出较大的组织差异，对中肠微粒体 P450 有较强的增溶作用，而对脂肪体微粒体 P450 的增溶作用不明显。因此，在选择去垢剂时，最好是根据不同组织来源的微粒体 P450 进行有针对性的选择。

3.2　不同浓度 CHAPS 对微粒体 P450 的增溶作用

由于去垢剂在高浓度时容易导致蛋白质变性，但去除去垢剂后一般可使蛋白质复性。为了避免蛋白质变性，去垢剂通常在较低浓度下使用，或在使用前确定其最佳使用浓度。由于不同微粒体 P450 含量差异较大，去垢剂的用量一般应根据微粒体蛋白浓度而不是 P450 含量确定(Ryan and Levin, 1990)。

本研究发现，CHAPS 对棉铃虫中肠和脂肪体微粒体 P450 增溶时表现出了浓度差异。对于中肠微粒体 P450，CHAPS 最适浓度为 0.5%；尽管 0.8% 和 1.1% 的 CHAPS 也有较高的增溶效率，但却引起中肠微粒体 P450 的强烈变性，因而也不适合于棉铃虫中肠微粒体 P450 的增溶。对脂肪体微粒体 P450，CHAPS 最适浓度为 0.5% 或 0.8%，1.1% CHAPS 也表现出较高的增溶效率，而且也未引起 P450 的变性。由此可知，即使将同一种去垢剂用于不同组织微粒体 P450 增溶时，其浓度效应也可能表现出较大差异。

致谢　中国农业大学应用化学系邱立红、中国科学院动物研究所李薇在试虫解剖中给予大力帮助，在此特别感谢。

参 考 文 献(References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 252.

Imaoka S, Funae Y, 1986. Ion-exchange high-performance liquid chromatography of membrane-bound protein cytochrome P450. *J. Chromatogr.*, 375: 83 – 90.

Omura T, Sato R, 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 22(7): 2 730 – 2 738.

Qiu XH, Li W, Tian Yu, Leng XF, 2003. Cytochrome P450 monooxygenases in the cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae): tissue difference and induction. *J. Econ. Entomol.*, 96(4): 1 283 – 1 289.

Roos PH, 1996. Chromatographic separation and behavior of microsomal cytochrome P450 and cytochrome b5. *J. Chromatogr. B*, 684: 107 – 131.

Ryan DE, Levin W, 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P450. *Pharmac. Ther.*, 45: 153 – 239.

Scharf M, Neal J, Marcus CB, Bennett GW, 1998. Cytochrome P450 purification and immunological detection in an insecticide resistant strain of German cockroach (*Blattella germanica* L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(1): 1-9.

Wheelock GD, Scott JG, 1989. Simultaneous purification of a cytochrome P450 and cytochrome b_5 from house fly *Musca domestica* L. *Insect Biochem.*, 19(5): 481-488.

Zheng MQ, Zhang WJ, Qiu XH, 2001. Purification and identification of cytochrome P450s. *Chinese Journal Pesticide Science*, 3(3): 11-17. [郑明奇,张文吉,邱星辉,2001. 细胞色素 P450 的纯化与鉴定. 农药学学报,3(3): 11-17]

(责任编辑: 黄玲巧)